

UC Irvine

UC Irvine Previously Published Works

Title

High correlation between isoenzyme classification and kinetoplast DNA variability in Trypanosoma cruzi.

Permalink

<https://escholarship.org/uc/item/2rm992fm>

Journal

Comptes Rendus Biologies, 304(4)

ISSN

1631-0691

Authors

Tibayrenc, M
Ayala, FJ

Publication Date

1987

Copyright Information

This work is made available under the terms of a Creative Commons Attribution License, available at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Peer reviewed

Comptes rendus de
l'Académie des sciences.
Série 3, Sciences de la vie

Académie des sciences (France). Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie. 1987/01-1987/05.

1/ Les contenus accessibles sur le site Gallica sont pour la plupart des reproductions numériques d'oeuvres tombées dans le domaine public provenant des collections de la BnF. Leur réutilisation s'inscrit dans le cadre de la loi n°78-753 du 17 juillet 1978 :

- La réutilisation non commerciale de ces contenus est libre et gratuite dans le respect de la législation en vigueur et notamment du maintien de la mention de source.

- La réutilisation commerciale de ces contenus est payante et fait l'objet d'une licence. Est entendue par réutilisation commerciale la revente de contenus sous forme de produits élaborés ou de fourniture de service.

[CLIQUER ICI POUR ACCÉDER AUX TARIFS ET À LA LICENCE](#)

2/ Les contenus de Gallica sont la propriété de la BnF au sens de l'article L.2112-1 du code général de la propriété des personnes publiques.

3/ Quelques contenus sont soumis à un régime de réutilisation particulier. Il s'agit :

- des reproductions de documents protégés par un droit d'auteur appartenant à un tiers. Ces documents ne peuvent être réutilisés, sauf dans le cadre de la copie privée, sans l'autorisation préalable du titulaire des droits.

- des reproductions de documents conservés dans les bibliothèques ou autres institutions partenaires. Ceux-ci sont signalés par la mention Source gallica.BnF.fr / Bibliothèque municipale de ... (ou autre partenaire). L'utilisateur est invité à s'informer auprès de ces bibliothèques de leurs conditions de réutilisation.

4/ Gallica constitue une base de données, dont la BnF est le producteur, protégée au sens des articles L341-1 et suivants du code de la propriété intellectuelle.

5/ Les présentes conditions d'utilisation des contenus de Gallica sont régies par la loi française. En cas de réutilisation prévue dans un autre pays, il appartient à chaque utilisateur de vérifier la conformité de son projet avec le droit de ce pays.

6/ L'utilisateur s'engage à respecter les présentes conditions d'utilisation ainsi que la législation en vigueur, notamment en matière de propriété intellectuelle. En cas de non respect de ces dispositions, il est notamment passible d'une amende prévue par la loi du 17 juillet 1978.

7/ Pour obtenir un document de Gallica en haute définition, contacter utilisationcommerciale@bnf.fr.

PARASITOLOGIE ANIMALE. — *Forte corrélation entre classification isoenzymatique et variabilité de l'ADN kinétoplastique chez Trypanosoma cruzi.* Note de **Michel Tibayrenc** et **Francisco José Ayala**, présentée par François Jacob.

Nous avons étudié avec 14 enzymes de restriction le polymorphisme de l'ADN kinétoplastique chez 21 isolats de *Trypanosoma cruzi* préalablement classés en 19 génotypes différents par l'analyse de 15 loci isoenzymatiques. Nous avons trouvé une corrélation élevée ($p < 0,001$) entre la proportion de bandes (fragments) de restriction communes à deux isolats donnés, et les identités génétiques correspondantes, calculées à partir de données isoenzymatiques. Ainsi, les deux classifications se confirment-elles mutuellement, et ceci suggère fortement que les deux types de variabilité (ADNk et isoenzymes) ont des taux d'évolution proportionnels au temps (horloges moléculaires). Les classifications phylogéniques ainsi obtenues peuvent servir de base rationnelle aux études médicales et épidémiologiques. Quoique corrélés, les deux types d'analyse ne fournissent pas des résultats identiques, et sont donc complémentaires. Les valeurs obtenues pour les proportions de bandes (fragments) de restriction communes se répartissent, comme les distances génétiques, selon un continuum. Ceci semble confirmer que les populations naturelles de *T. cruzi* montrent un large éventail de génotypes plutôt qu'un nombre restreint de souches principales différant fortement les unes des autres.

ANIMAL PARASITOLOGY. — High correlation between isozyme classification and kinetoplast DNA variability in *Trypanosoma cruzi*.

By means of 14 restriction enzymes, we have studied the kinetoplast DNA polymorphism in 21 *Trypanosoma cruzi* isolates previously classified into 19 different genotypes based on the analysis of 15 isozyme loci. We have found a high correlation ($p < 0.001$) between the proportion of restriction bands (fragments) common to any two given isolates and the corresponding genetic identities calculated from the isozyme data. This shows that the two classifications (kDNA and isozymes) corroborate one another and strongly suggests that the two types of variability are correlated with time (molecular clocks). The phylogenetic classifications so obtained can be used as rational bases for medical and epidemiological studies. Although they are correlated, the two types of analysis are complementary as they do not yield identical results. Like the isozyme genetic distances and genetic identities, the values obtained for the proportion of common restriction bands (fragments) exhibit a continuum. This seems to confirm that natural *T. cruzi* populations exhibit a wide range of genotypes rather than a few well-differentiated clusters of strains.

Morel et coll. ont introduit une méthode de classification des variants de *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas, méthode basée sur l'analyse de la variabilité de l'ADN kinétoplastique par endonucléases de restriction (analyse schizodémique) [1].

Nous avons par ailleurs proposé une interprétation génétique des zymogrammes de ce même parasite [2] ayant montré que ses populations naturelles étaient composées de clones diploïdes très diversifiés d'un point de vue génétique, la recombinaison génétique étant rare ou absente parmi eux ([3], [4]). Nous avons utilisé la distance génétique de Nei ($D =$ nombre moyen de codons différents par gène entre deux populations) [5] pour quantifier les relations phylogéniques existant entre ces clones naturels ([4], [6]). Nous présentons ici les premiers résultats d'une comparaison entre cette classification isoenzymatique et une quantification de l'analyse schizodémique.

21 stocks de *Trypanosoma cruzi*, représentant 19 génotypes différents préalablement établis par l'analyse de 15 loci isoenzymatiques [4], ont été étudiés. La figure 1 montre un réseau de Wagner ([7], [8]) visualisant les relations phylogéniques entre les différents génotypes. Dans ce réseau, les numéros désignant les génotypes correspondent à ceux d'un travail antérieur [4]. Dans le présent échantillon, les génotypes 32 et 39 sont chacun représentés par deux isolats différents, les autres génotypes, par un seul isolat. Les méthodes utilisées pour la culture, la récolte et le stockage des parasites ont été décrites antérieurement [9]. L'isolement de l'ADN kinétoplastique du parasite a été conduit selon la méthode de Morel et coll. [1] avec quelques modifications. La richesse des échantillons en ADN a été estimée par visualisation directe de la fluorescence au bromure d'éthidium [10]. Une quantité d'ADN d'environ 2 à 5 μ g a été utilisée pour chaque digestion. Les

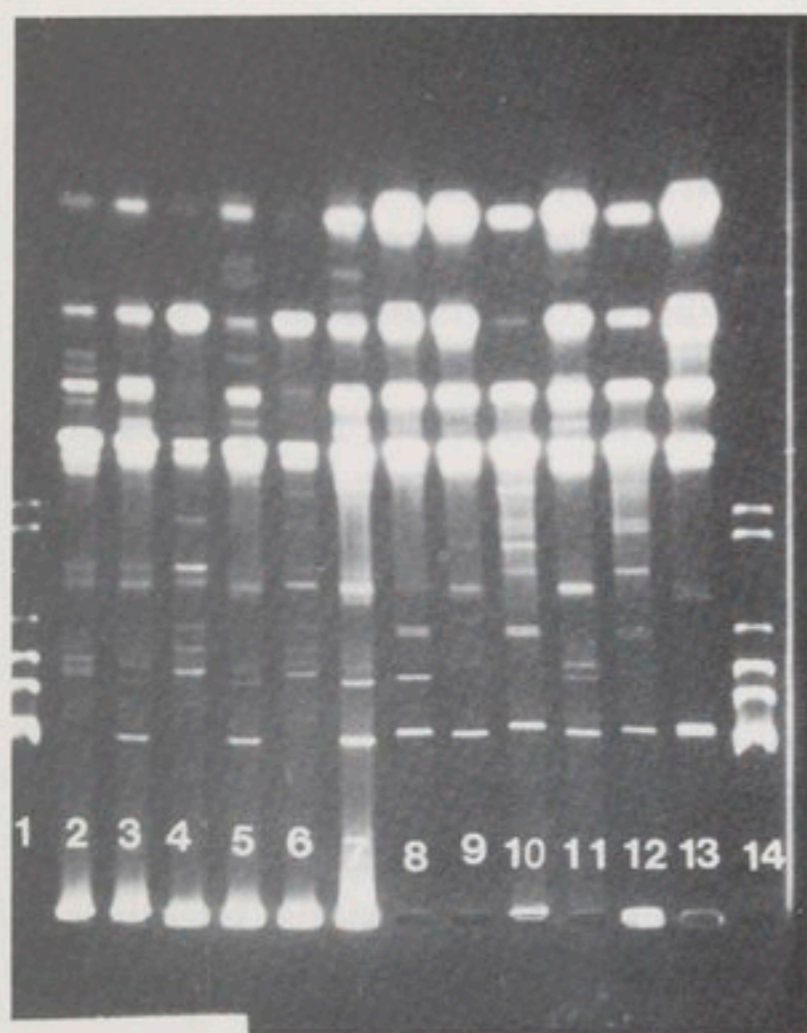


Fig. 2

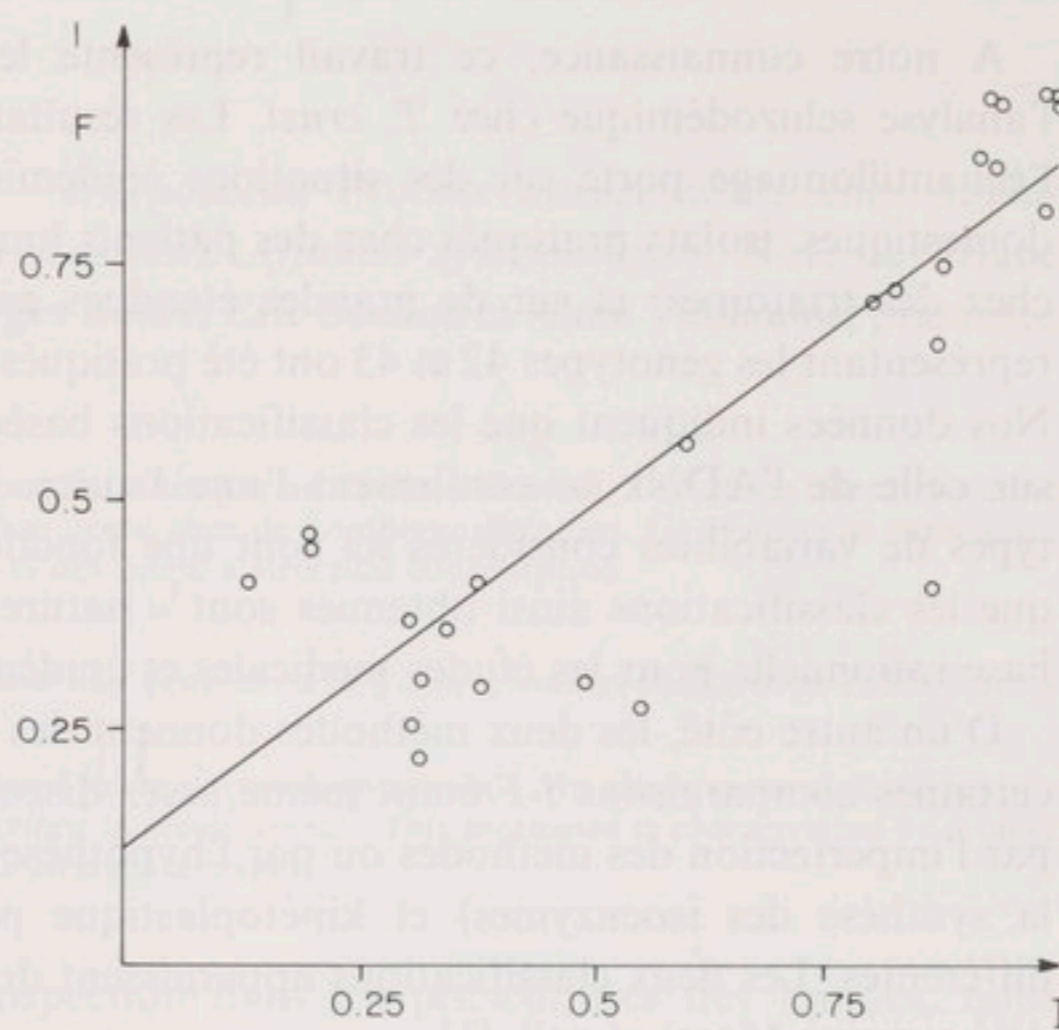


Fig. 3

Fig. 2. — Photographie d'un gel d'argarose montrant la variabilité de l'ADN kinétoplastique (analyse schizodémique) chez différents génotypes isoenzymatiques de *Trypanosoma cruzi*. Les échantillons 1 et 14 sont des marqueurs (phage λ digéré par l'enzyme de restriction *HindIII*). Les échantillons n° 2 à 7 ont été digérés par l'enzyme de restriction *EcoRI*. Les échantillons n° 8 à 13 l'ont été par l'enzyme *HaeIII*. Échantillons 2 et 8 = génotype isoenzymatique 29; échantillons 3 et 9 = génotype 9; échantillons 4 et 10 = génotype 39; échantillons 5 et 11 = génotype 17; échantillons 6 et 12 = génotype 37; échantillons 7 et 13 = génotype 12 (voir fig. 1). On peut voir que les génotypes 37 et 39, très apparentés par leurs isoenzymes, partagent un grand nombre de bandes de restriction communes, et que ces bandes montrent en général une intensité de révélation similaire.

Fig. 2. — Photograph of an agarose gel showing the kinetoplast DNA variability (schizodeme analysis) in a set of *T. cruzi* isozyme genotypes. Samples 1 and 14 are markers (phage λ digested with the restriction enzyme *HindIII*). Samples 2 to 7 were digested with the restriction enzyme *EcoRI*, samples 8 to 13 were digested with the enzyme *HaeIII*. Samples 2 and 8 = isozyme genotype 29; samples 3 and 9 = genotype 9; samples 4 and 10 = genotype 39; samples 5 and 11 = genotype 17; samples 6 and 12 = genotype 37; samples 7 and 13 = genotype 12 (see Fig. 1). One can see that the closely related isozyme genotypes 37 and 39 share a high number of common restriction bands, and that these bands have generally the same staining intensity.

Fig. 3. — Corrélation entre l'identité génétique *I* mesurée pour 15 loci isoenzymatiques et le coefficient *F* (proportion de bandes d'ADNk communes, obtenues par l'emploi de six enzymes de restriction). La corrélation porte sur 26 comparaisons par paires d'isolats de *T. cruzi*. L'équation de la droite est $F = 0,124 + 0,718 I$.

Fig. 3. — Correlation between genetic identity *I* calculated from 15 isozyme loci and coefficient *F* (proportion of common kDNA bands based on six restriction enzymes). The correlation involves 26 pairwise comparisons between *T. cruzi* isolates. The equation for the regression line is $F = 0.124 + 0.718 I$.

hautement significative entre *I* et *F* ($p < 0,001$). L'information fournie par les différentes enzymes de restriction semble assez redondante, puisque nous avons obtenu des coefficients *F* similaires, que l'analyse ait été conduite avec 3, 6 ou 12 enzymes. Dans les trois cas, la corrélation avec *I* donne un niveau de signification comparable. La figure 3 montre la droite de corrélation entre *I* et *F* obtenue avec six enzymes de restriction. Le nombre de comparaisons par paire étant inférieur à 30, nous avons complété cette analyse par un test non paramétrique de Spearman. Le résultat obtenu (*F* étant fondé sur l'emploi de six enzymes) confirme la forte corrélation entre *I* et *F* ($r' = 0,76$, $p < 0,001$).

L'analyse visuelle révèle également un autre élément de similitude de l'ADNk entre isolats similaires ou semblables quant à leurs isoenzymes : non seulement de tels isolats ont une forte proportion de bandes de restriction communes, mais encore ces bandes montrent-elles une intensité de coloration en général similaire (fig. 2). De tels résultats se prêtent bien sûr mal à une quantification.

A notre connaissance, ce travail représente le premier essai de quantification de l'analyse schizodémique chez *T. cruzi*. Les résultats sont d'autant plus significatifs que l'échantillonnage porte sur des situations épidémiologiques variées (cycles sylvestres et domestiques, isolats pratiqués chez des patients humains, chez des mammifères sauvages, chez des triatomés) et sur de grandes étendues géographiques (par exemple, les isolats représentant les génotypes 42 et 43 ont été pratiqués respectivement en Bolivie et au Chili). Nos données indiquent que les classifications basées sur la variabilité des isoenzymes et sur celle de l'ADNk se confirment l'une l'autre. Ceci suggère fortement que les deux types de variabilités considérés ici sont une fonction du temps (horloge moléculaire) et que les classifications ainsi obtenues sont « naturelles », phylogéniques, fournissant une base rationnelle pour les études médicales et épidémiologiques.

D'un autre côté, les deux méthodes donnent des résultats corrélés mais pas identiques, certaines comparaisons *I-F* étant même assez discordantes (fig. 3). Ceci peut s'expliquer par l'imperfection des méthodes ou par l'hypothèse que les ADN nucléaire (commandant la synthèse des isoenzymes) et kinétoplastique peuvent subir des pressions sélectives différentes. Les deux classifications apparaissent donc complémentaires, comme l'avaient déjà suggéré Morel et coll. [1].

Enfin, les valeurs obtenues pour le coefficient *F*, comme celles de *I* et *D*, se répartissent selon un continuum, tous les intermédiaires existant entre les résultats extrêmes. Ceci est en faveur de notre hypothèse [4] selon laquelle les variants naturels de *T. cruzi* ne se limitent pas à un nombre restreint de souches principales (principal zymodemes) très différentes les unes des autres ([12], [13]) : il semble au contraire qu'un large éventail de génotypes différents soient représentés parmi les clones naturels de *T. cruzi*, et qu'une approche typologiste de cette variabilité soit spécialement erronée.

Nous remercions B. Kahane (Institut Pasteur de Paris) de nous avoir conseillé utilement pour l'isolement de l'ADNk, et Clara Camacho (IBBA de La Paz en Bolivie) pour son aide technique efficace dans la récolte des isolats de *T. cruzi*. Nous remercions les scientifiques suivants pour certains des isolats de *T. cruzi* : J.-P. Dedet (Institut Pasteur de Cayenne), C. La fuente (CENETROP de Santa Cruz, Bolivie), F. Le Pont (IBBA de La Paz, Bolivie), D. Le Ray (IMT « Prince Leopold » d'Anvers, Belgique) et M. A. Miles (École de médecine tropicale de Londres, Angleterre). Nous remercions enfin H. Bellen et S. Shattuk (université de Davis, Californie) pour leur aide dans l'analyse informatique des données.

Reçue le 8 septembre 1986, acceptée le 15 décembre 1986.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. MOREL et coll., *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.*, 77, 1980, p. 6810.
- [2] M. TIBAYRENC, M. L. CARIU et M. SOLIGNAC, *Comptes rendus*, 292, série III, 1981, p. 623-625.
- [3] M. TIBAYRENC et coll., *Comptes rendus*, 293, série III, 1981, p. 207-209.
- [4] M. TIBAYRENC et coll., *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.*, 83, 1986, p. 115.
- [5] M. NEI, *Amer. Nat.*, 106, 1972, p. 283.
- [6] M. TIBAYRENC et M. A. MILES, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77, 1983, p. 76.
- [7] J. S. FARRIS, *Syst. Zool.*, 19, 1970, p. 83.
- [8] J. FELSENSTEIN, *Syst. Zool.*, 27, 1978, p. 401.
- [9] M. TIBAYRENC et D. LE RAY, *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 64, 1984, p. 239.
- [10] T. MANIATIS, E. F. FRITSCH et J. SAMBROCK, *Molecular cloning, a laboratory manual.*, C.S.H. Laboratory, 1982, p. 468.
- [11] P. BOURSOT et F. BONHOMME, *Genet. Sél. Evol.*, 18, 1986, p. 73.
- [12] P. P. READY et M. A. MILES, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74, 1979, p. 238.
- [13] W. C. GIBSON et M. A. MILES, *Brit. Med. Bull.*, 41, 1985, p. 115.

M. T. et F. J. A. : Department of Genetics,
University of California, Davis, CA95616, U.S.A.;
M. T. : Adresse permanente : Entomologie médicale,
O.R.S.T.O.M., Miniparc, rue des Apothicaires, 34100 Montpellier.

PARASITOLOGIE ANIMALE. — *Un nouveau Protiste intracellulaire chez Salmo gairdneri Richardson, 1836 (Poisson Téléostéen). Affinités systématiques.* Note de **Ariane van de Moer, Jehanne-F. Manier, Georges Bouix, Eric Sochon et Aimé Vuillaume**, présentée par Constantin Vago.

Les macrophages de Truites arc-en-ciel 1+ sont parasités par un Protiste inconnu. Une étude ultrastructurale permet de le rapprocher du genre *Dermocystidium* décrit chez de nombreux Poissons. Ce Protiste se caractérise par une large vacuole d'origine mitochondriale et des corps à structure concentrique.

ANIMAL PARASITOLOGY. — A new intracellular protozoon of *Salmo gairdneri* Richardson 1836 (Teleostean Fish). Taxonomic affinities.

Macrophages of 1+ rainbow trout are parasitised by an unknown protozoan. An ultrastructural study permits to close it with the genus Dermocystidium described in many fishes. This protozoan is characterized by a large vacuole of mitochondrial origin and by concentric structured bodies.

INTRODUCTION. — Lors d'une prospection dans les piscicultures des Landes, nous avons trouvé un Protiste intracellulaire dans les macrophages des reins de Truites arc-en-ciel 1+ (*Salmo gairdneri*). Un taux élevé de mortalité due à la néphrite interstitielle hyperplasique [1] associée à des infections secondaires (SHV, myxobactérioses, saprolégnioses, costiasse) a été enregistré dans ces piscicultures pendant l'année 1985. Le nouveau Protiste intracellulaire se trouve essentiellement dans les reins de Truites 1+ ayant survécu à PKD (Proliferative Kidney Disease ou néphrite interstitielle hyperplasique).

Nous avons comparé ses ultrastructures avec celles décrites chez d'autres Protistes parasites intracellulaires afin de préciser sa position taxonomique.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — Des autopsies effectuées en mars 1986 sur des Poissons provenant de bassins contaminés par PKX durant l'été 1985, révèlent la présence de lésions macroscopiques au niveau des reins de deux individus sur soixante disséqués. Ces lésions rappellent celles provoquées par PKX : reins hypertrophiés, de couleur marron, tachetés de points grisâtres et d'aspect granulomateux. Nous utilisons la technique des appositions [2] suivie par une coloration de May-Grünwald-Giemsa pour déceler rapidement la présence du parasite.

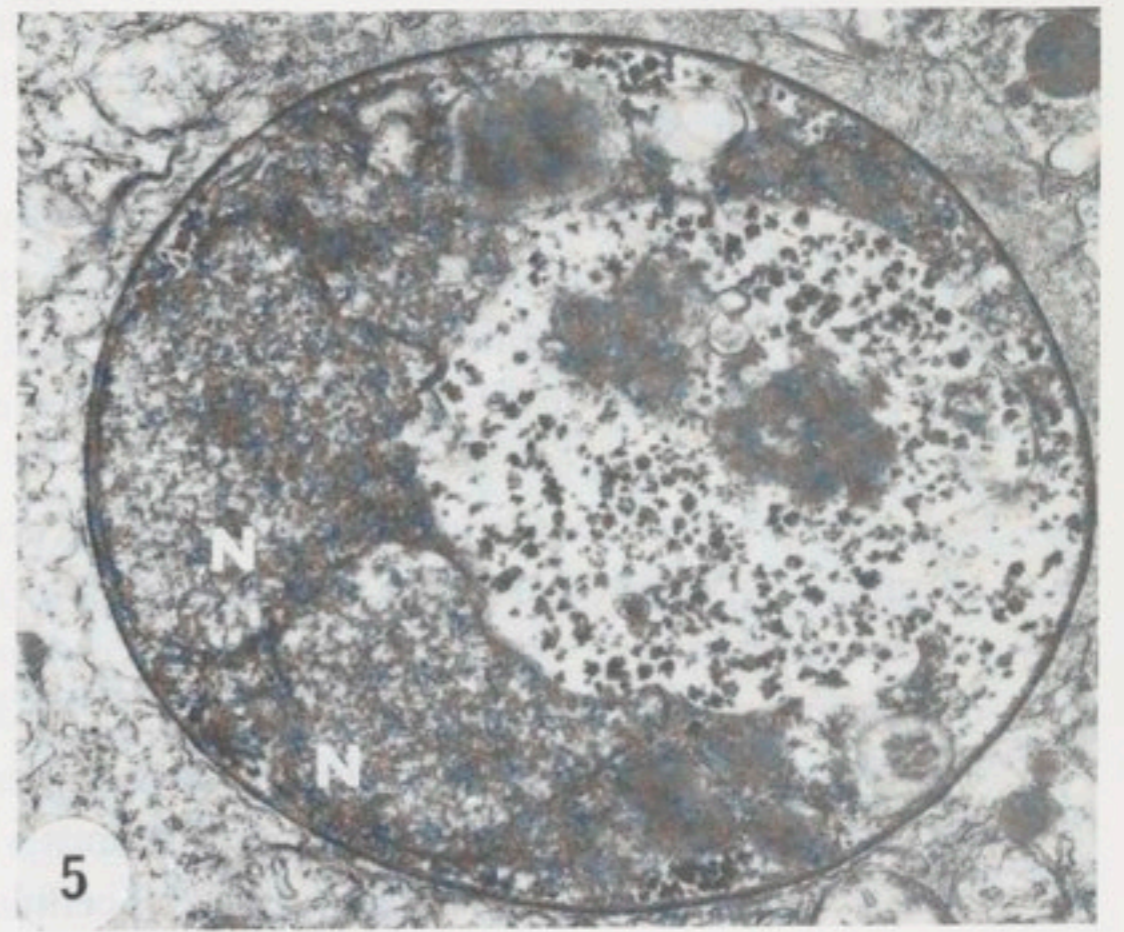
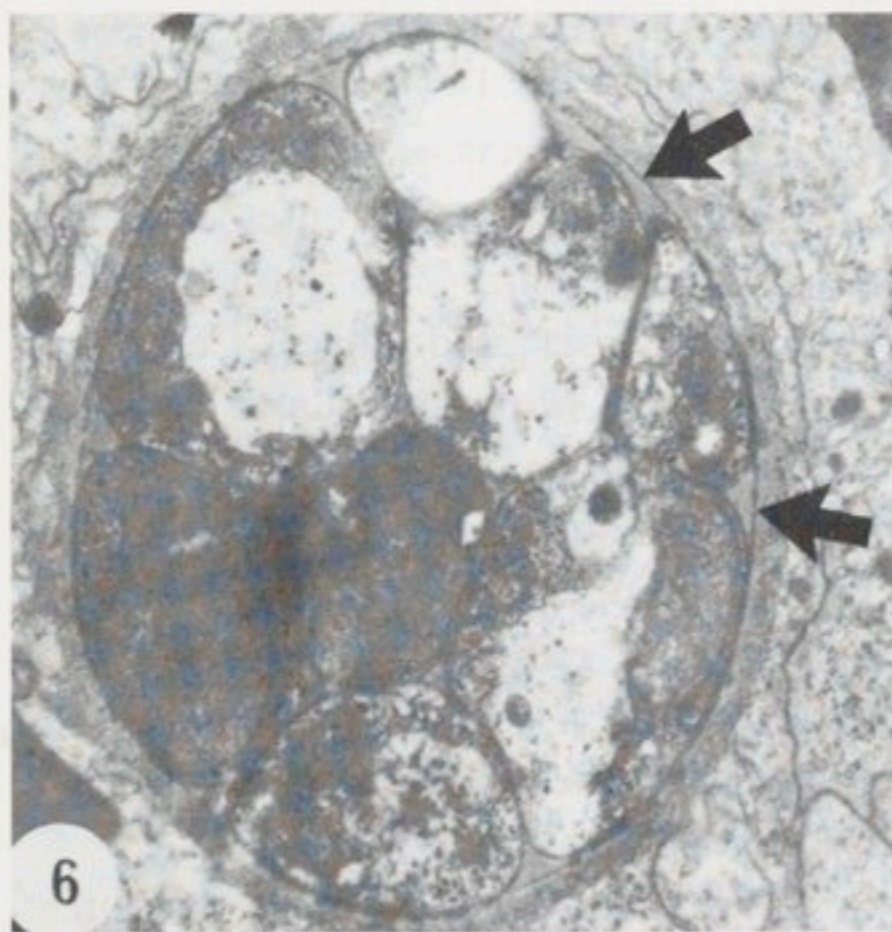
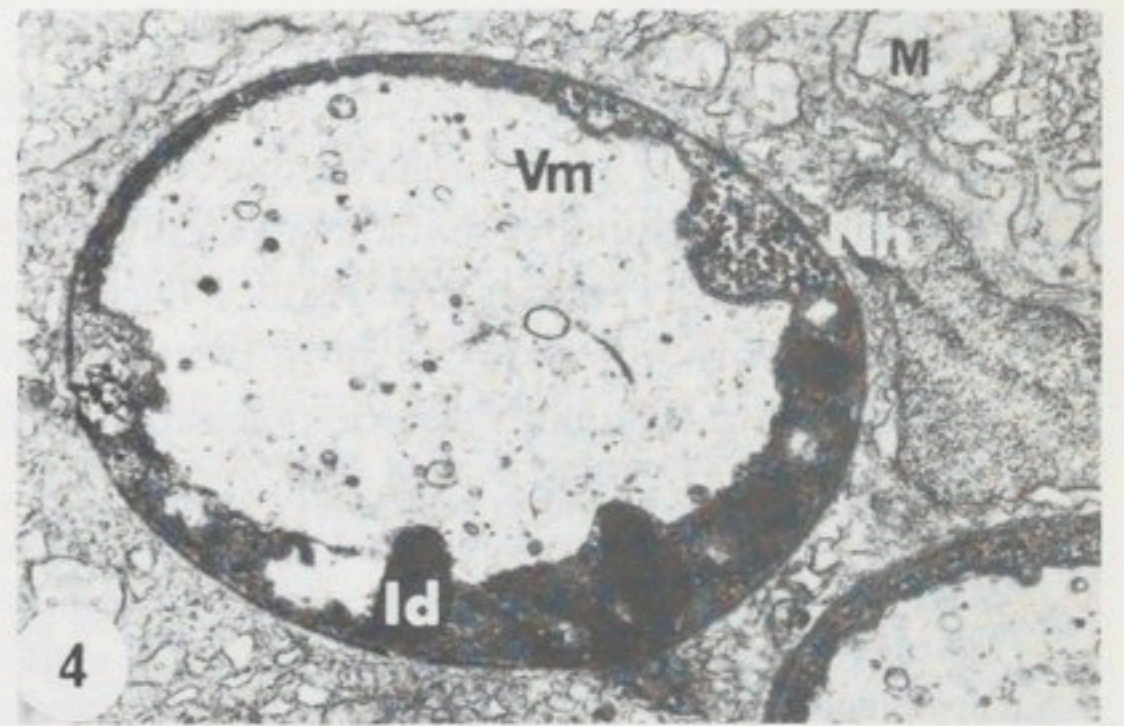
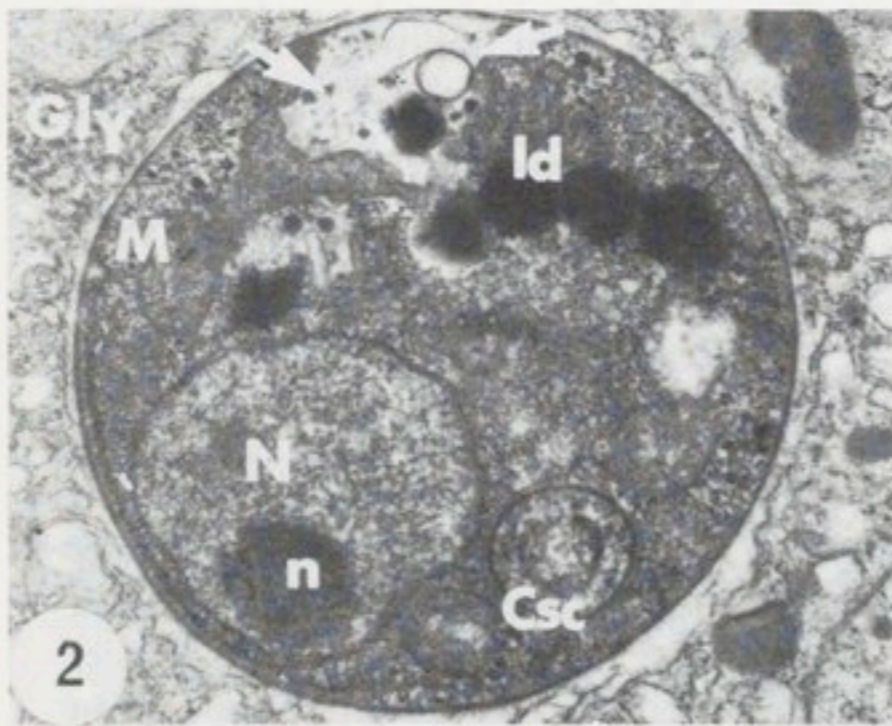
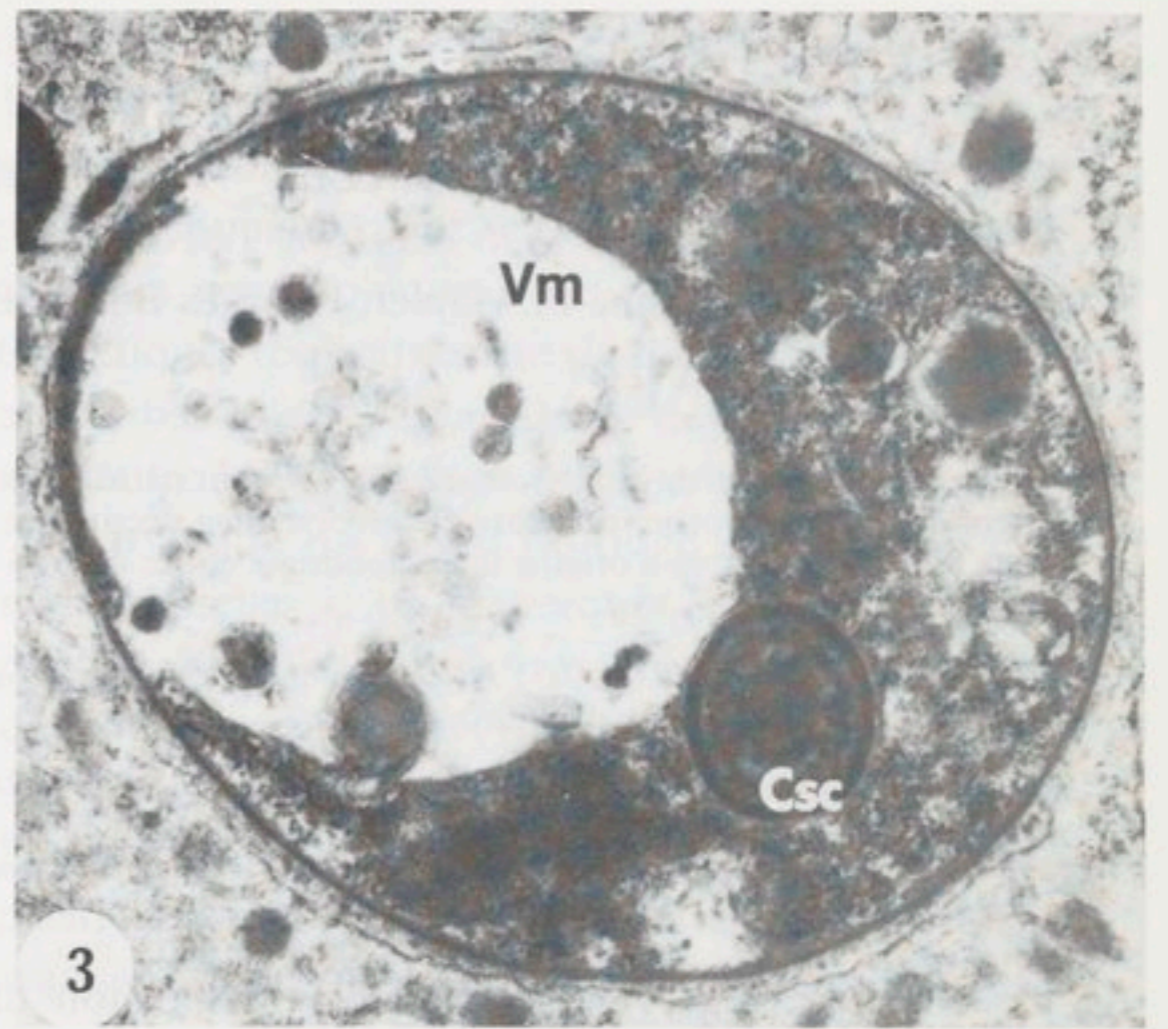
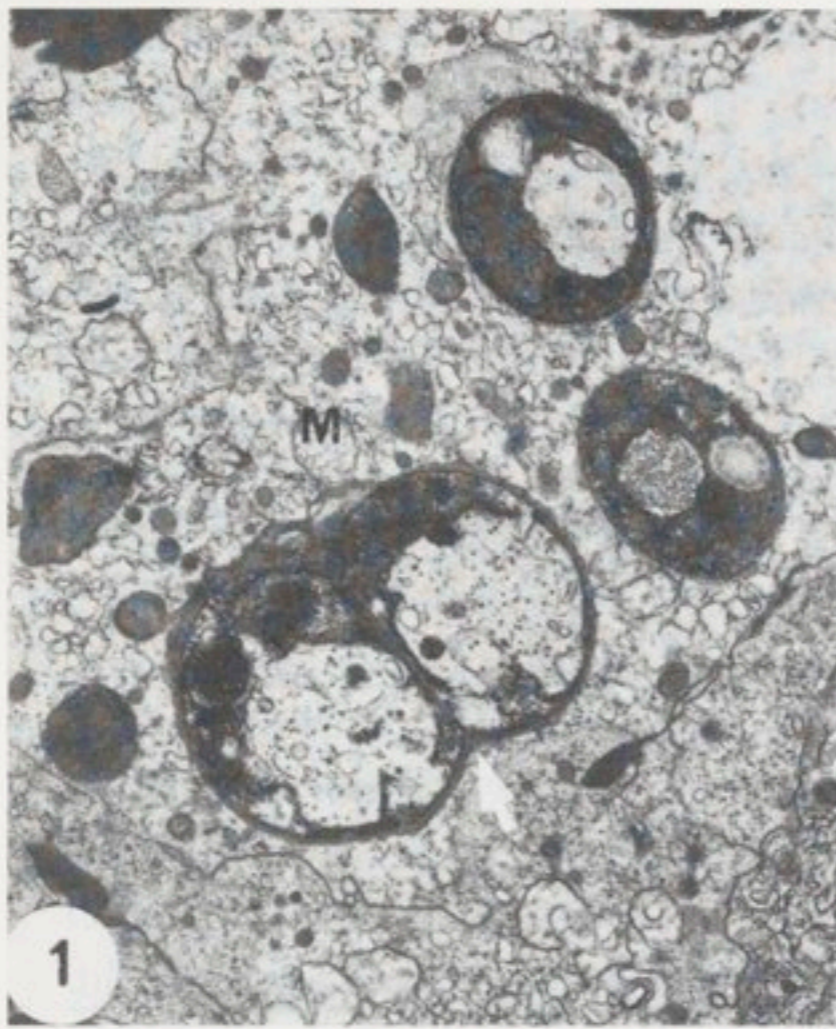
Des fragments de reins sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 1,5% et post-fixés dans une solution de OsO₄ à 1% puis inclus dans le Spurr. Les coupes ultrafines sont contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

RÉSULTATS. — Les appositions colorées montrent la présence de nombreuses cellules parasites à l'intérieur des macrophages du rein. Elles mesurent entre 2 et 8 µm et leur cytoplasme est basophile à l'exception de quelques points denses acidophiles. Certains macrophages sont envahis par ces cellules et éclatent, libérant le parasite dans le tissu interstitiel.

Les organismes parasites sont souvent vacuolisés : une grande vacuole est déjà visible en microscopie photonique et repousse le cytoplasme à la périphérie de la cellule.

Les observations en microscopie électronique confirment la nature de la cellule-hôte qui est un macrophage altéré par la présence des corps étrangers (*fig. 1*). Des plages de cytoplasme vacuolisé, des grains de glycogène, des mitochondries disposées autour des parasites et un réticulum endoplasmique sont visibles (*fig. 1, 2*).

Nous avons observé deux types de cellules parasites : des formes jeunes et non vacuolisées, de 2 à 3 µm de diamètre (*fig. 2*) et des formes plus âgées et vacuolisées, de 3 à 8 µm (*fig. 3, 4 et 5*). Ces dernières viennent parfois de se diviser (*fig. 1*). Un ou deux noyaux (*fig. 5*) sont visibles par plan de coupe. La vacuole arrive à occuper la plus



EXPLICATIONS DES FIGURES

Fig. 1. — Cellule hôte (macrophage) hébergeant plusieurs *Dermocystidium* dont un venant de se diviser (flèche) (G × 7 500).

Fig. 1. — Host cell (macrophage) containing several *Dermocystidium*; one has just divided (arrow) (M × 7,500).

Fig. 2. — Forme jeune : noter la vacuolisation de la mitochondrie (flèche) (G × 13 300).

Fig. 2. — Young form: note the vacuolisation of the mitochondrium (arrow) (M × 13,300).

Fig. 3, 4, 5. — Formes plus âgées à différents stades [fig. 3 : (G × 16 4000); fig. 4 : (G × 11 100); fig. 5 : (G × 13 300)].

Figs. 3, 4, 5. — More advanced forms at different stages [Fig. 3 : (M × 16,400); Fig. 4 : (M × 11,100); Fig. 5 : (M × 13,300)].

Fig. 6. — Stade « en rosette » regroupant au moins huit cellules entourées par une paroi commune [flèche (G × 8 000)].

Fig. 6. — Rosette of at least eight cells enclosed by a common cell wall (arrow) (M × 8,200).

Csc, corps à structure concentrique; Gly, glycogène; Id, inclusion dense; M, mitochondrie; N, noyau; Nh, noyau de la cellule hôte; n, nucléole; Vm, vacuole mitochondriale.

Csc, concentric structured body; Gly, glycogen; Id, electron dense inclusion; M, mitochondrium; N, nucleus; Nh, nucleus of the host cell; n, nucleole; Vm, mitochondrial vacuole.

grande partie du cytoplasme; elle provient de l'hypertrophie considérable des mitochondries. Au terme de son évolution, la nature mitochondriale de la vacuole est encore révélée par le double système membranaire qui la limite.

Le Protiste de *S. gairdneri* renferme en outre des inclusions denses [souvent rejetées dans la vacuole (fig. 4)] et des corps à structure concentrique de 0,36 à 0,90 µm, limités par une membrane externe et présentant une medulla dense (fig. 2 et 3). La grande taille et le très petit nombre par cellule de ces organites, empêchent de les rapprocher des haplosporosomes décrits par Perkins [3] chez les *Ascetospora*.

Des stades regroupant deux ou plusieurs éléments à l'intérieur d'une enveloppe commune sont également visibles (fig. 1, 6).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — Plusieurs observations conduisent à une comparaison entre le Protiste rénal de *S. gairdneri* et *Bonamia ostreae*, parasite de l'Huître *Ostrea edulis* ([4], [5]) : infestation diffuse, localisation dans les cellules sanguines de l'hôte, hypertrophie et vacuolisation mitochondriale, présence de corps denses à structure concentrique.

Cependant, nous n'hésitons pas à rapprocher le parasite de *S. gairdneri* du genre *Dermocystidium* dont de nombreuses espèces ont été rencontrées chez les Poissons, plus particulièrement chez les Salmonidés [6]. Certes, les dermocystidioses se manifestent par la formation de nodules ou kystes branchiaux et sous-cutanés [7]. Les affinités structurales et ultrastructurales restent néanmoins frappantes : formation de rosettes et évolution par divisions endogènes, vacuole et inclusions vacuolaires, organites cytoplasmiques (Perkins, 1969, McVicar et Wootten, 1980).

Nous serions alors en présence d'une nouvelle forme de *Dermocystidium* se caractérisant par une infestation diffuse et systémique.

Reçue le 15 décembre 1986.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] P. DE KINKELIN, Ch. MICHEL et P. GHITTINO, *Précis de pathologie des Poissons*, I.N.R.A.-OIE, 1985, p. 1-332.
- [2] R. CLIFTON-HADLEY et R. H. RICHARDS, *Veterinary Record*, 112, 1983, p. 609.

- [3] F. O. PERKINS, *J. Parasitol.*, 57, 1971, p. 9-23.
[4] F. O. PERKINS, *J. Invert. Pathol.*, 13, 1969, p. 199-222.
[5] Y. PICHOT, M. COMPS, G. TIGE, H. GRIZEL et M. A. RABOUIN, *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 43, 1980, p. 131-140.
[6] M. COMPS, *Thèse d'État*, U.S.T.L. Montpellier, p. 1-128, 1983.
[7] W. E. RIBELIN et G. MIGAKI, *The Pathology of Fishes*, University of Wisconsin Press, 1975, p. 1-1004.
[8] H. REICHENBACH-KLINKE et E. ELKAN, *The principal diseases of lower vertebrates*, Academic Press, 1965, p. 1-600.
[9] A. H. McVICAR et R. WOOTTEN, *Fish Dis.*, 1980, p. 165-173.

Laboratoire d'Ichthyologie et de Parasitologie générale,
place Eugène-Bataillon, 34060 Montpellier Cedex
et Direction des Services vétérinaires des Landes,
avenue Pasteur, 40000 Mont-de-Marsan.

NEUROBIOLOGIE. — *Effet de gangliosides exogènes sur le métabolisme des composés à inositol dans les neurones de poulet en culture primaire.* Note de **Blandine Ferret, Raphaël Massarelli, Louis Freysz et Henri Dreyfus**, présentée par Jean-Pierre Changeux.

Un mélange de gangliosides additionné à une concentration de 10^{-8} M et de 10^{-5} M au milieu de culture de neurones de poulet stimule le métabolisme des composés à inositol. L'incorporation de [3 H] myo-inositol est augmentée notamment dans le phosphatidylinositol et l'inositol triphosphate. Les gangliosides en augmentant ainsi la production de seconds messagers réguleraient les processus de phosphorylation de protéines neuronales.

NEUROBIOLOGY. — Effect of exogenous gangliosides on the metabolism of inositol compounds in chick neurons in primary culture.

A mixture of exogenous gangliosides at 10^{-8} M and 10^{-5} M concentration added to the medium of chick neurons stimulates the metabolism of inositol compounds. Notably the incorporation of [3 H] myo-inositol is increased in phosphatidylinositol and in inositol triphosphate. Gangliosides, hence, by increasing the production of second messengers might regulate the phosphorylation processes of neuronal proteins.

INTRODUCTION. — Le rôle biologique des gangliosides dans la membrane plasmique des cellules nerveuses n'est pas encore bien défini. Ces glycolipides ont été impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires dont la réception de toxines et de neuromodulateurs [1], ainsi que dans la reconnaissance, la prolifération et la maturation cellulaire [2]. Ces mécanismes sous-tendent l'activation de systèmes à seconds messagers qui sont à l'origine des réponses cellulaires et il est possible que les gangliosides soient capables de moduler l'activité de ces systèmes. Cette hypothèse est renforcée par les données rapportées dans ce travail qui révèlent que, dans les neurones de poulet en culture primaire, les gangliosides stimulent le métabolisme des composés à inositol avec une production accrue des seconds messagers, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP3).

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les cultures ont été obtenues par dissociation mécanique des hémisphères cérébraux d'embryons de poulet âgés de 8 jours. Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Petri recouvertes d'un film de poly-L-lysine selon la méthode de Pettmann et coll. [3]. Les neurones ont été mis en culture dans un milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM), contenant 10% de sérum fœtal de veau et ont été maintenus dans une atmosphère enrichie en 5% de CO_2 . Au 3^e jour de culture, le milieu est remplacé par un milieu chimiquement défini (MCD), dépourvu de sérum et contenant par litre de DMEM : 5 mg d'insuline, 16 mg de putrescine, 100 mg de transferrine, 10^{-12} mole d'œstradiol, $2 \cdot 10^{-8}$ mole de progestérone et $2 \cdot 10^{-8}$ mole de sélénite de sodium. Une partie des cultures est traitée par un mélange de gangliosides (GM1 19,8%, GD3 5,2%, GD1a 39,6%, GD1b 14,6%, GT1b 17,6%, GQ1 3,2%, Fidia) à des concentrations finales de 10^{-5} M et de 10^{-8} M. Ces concentrations se situent, respectivement, au-dessus et en dessous de la concentration micellaire critique. Au cinquième jour de culture, le milieu est remplacé par un milieu identique et les analyses sont effectuées au 6^e jour. Des études sur la morphologie et la biochimie de ces neurones en culture ont déjà été décrites ([4], [5]). Le métabolisme des composés à inositol a été étudié en incubant ces neurones avec de l' [3 H]myo-inositol. Pour plus de détails, voir la légende du tableau.

RÉSULTATS. — L'incorporation de l'inositol augmente dans l'homogénat cellulaire des neurones traités par les gangliosides (tableau) sans affecter la cinétique de sa capture (résultats non publiés). Des résultats préliminaires ont montré que, à partir de 18 à 20 h d'incubation, le taux de radioactivité dans l'homogénat atteint un plateau de saturation. Après la séparation des composés hydrosolubles, par chromatographie sur colonne, l'incorporation de l'inositol radioactif sous sa forme libre, dans le glycérophospho-inositol, dans le 1,2-inositolphosphate cyclique et dans l'inositol triphosphate (IP3), est augmentée d'environ deux fois, et d'une façon similaire, dans les cellules traitées aux gangliosides à des concentrations de 10^{-8} M et de 10^{-5} M. Par contre, aucune différence n'a été remarquée dans le marquage radioactif de l'inositol phosphate et de l'inositol diphosphate.

TABLEAU

Incorporation et métabolisme du [^3H] myo-inositol
dans des neurones de poulet en culture primaire.

*Incorporation and metabolism of [^3H] myo-inositol
in chick neurons in primary culture.*

DPM. 10^3 /mg protéine	MCD	GG 10^{-8} M	GG 10^{-5} M
Homogénat.	393,87	521,03	473,76
		(^a)	(^a)
PI.	9,4	33,00	35,10
		(^a)	(^a)
Ins	92,20	170,20	148,30
		(^a)	(^a)
GPI	2,05	3,90	4,26
		(^a)	(^a)
IPc	5,08	8,18	6,82
		(^a)	(^a)
IP.	3,98	4,04	3,92
IP2.	1,68	1,62	1,50
IP3.	2,18	4,14	3,68
		(^a)	(^a)

Les neurones de poulet ont été incubés 25 h (au 5^e jour en culture) avec du [^3H]myo-inositol (activité spécifique : 14,2 Ci/mole, Amersham, 1 $\mu\text{Ci/ml}$) dans 4 ml de milieu défini (MCD) contenant 44 μM d'inositol. L'incubation est arrêtée par le lavage des cultures avec une solution de Krebs-Ringer contenant 5 mM de LiCl afin de bloquer la dégradation des phosphates à inositol. Les cellules sont récoltées et homogénéisées dans 2 ml d'eau bidistillée. Une partie aliquote de l'homogénat est prélevée pour la détermination de la radioactivité, mesurée avec 0,5 ml d' H_2O et 10 ml de Rotiszint-22 (Roth) dans un scintillateur « Packard 4000 ». La quantité des protéines est dosée sur une autre partie aliquote selon la méthode de Lowry et coll. [6]. Les phospholipides et les composés hydrosolubles à inositol ont été séparés suivant la méthodologie employée par Brown et coll. [7]. PI, phosphatidylinositol; Ins, inositol; GPI, glycérophosphoinositol; IPc, inositol phosphate cyclique; IP, inositol phosphate; IP2, inositol diphosphate; IP3, inositol triphosphate; GG, gangliosides; MCD, milieu chimiquement défini. Les valeurs exprimées en dpm/mg protéine représentent la moyenne de six valeurs (l'écart-type n'excède pas 5%). (^a) Valeurs significativement différentes du contrôle par $2 P < 0,02$ (selon le test de Student).

Chick neurons have been incubated for 25 hrs. (starting from the 5th day in culture) with [^3H]myo-inositol (specific activity: 14.2 Ci/mole, Amersham, 1 $\mu\text{Ci/ml}$) in 4 ml of MCD containing 44 μM of inositol. The incubation was stopped by washing the cultures with a Krebs-Ringer solution containing 5 mM of LiCl to block the degradation of inositol phosphates. Afterwards the cells were collected and homogenized in 2 ml of distilled water. An aliquot of the homogenate was counted for radioactivity with 0.5 ml of H_2O and 10 ml of Rotiszint 22 (Roth) using a Packard 4000 scintillation spectrometer. Proteins were determined on a second aliquot by the method of Lowry et al. [6]. Phospholipids and hydrosoluble compounds containing inositol have been separated by the methodology used by Brown et al. [7]. PI, phosphatidylinositol; Ins, inositol; GPI, glycerophosphoinositol; IPc, cyclic inositol phosphate; IP, inositol phosphate; IP2, inositol diphosphate; IP3, inositol triphosphate; GG, gangliosides; MCD, chemically defined medium. Values expressed in dpm/mg protein represent the average of six determinations (the standard deviation was lower than 5%). (^a) Statistically significant by at least $2 P < 0.02$ (Student's t-test).

La radioactivité contenue dans le phosphatidylinositol (PI, représentant 95% des composés lipidiques marqués après séparation par chromatographie sur couche mince) est augmentée, d'environ quatre fois, après traitement des neurones avec les gangliosides (tableau).

DISCUSSION. — Un des effets le plus marquant des gangliosides sur la morphologie des neurones est la production d'un bourgeonnement des neurites accompagné d'autres

modifications morphologiques et biochimiques [5]. De tels effets laissent supposer que les gangliosides, après leur insertion dans la membrane plasmique, peuvent provoquer des réponses cellulaires par l'intermédiaire de seconds messagers. L'ensemble des résultats obtenus montre que les gangliosides stimulent le métabolisme des composés à inositol conduisant à la production d'IP3 et de DAG. L'IP3 a la capacité de mobiliser les ions calcium intracellulaires [8] et le DAG est un activateur de la protéine kinase C [9]. En effet, des résultats récents montrent que l'adjonction de gangliosides dans le milieu de culture des neurones augmente la production de DAG intracellulaire (résultats non publiés). Ces données suggèrent que les gangliosides, par l'intermédiaire des seconds messagers (IP3 et DAG), peuvent réguler les processus de phosphorylation protéique impliqués dans la médiation des réponses cellulaires.

Nous remercions M. Alphonse Hubsch pour son excellente aide technique et M^{me} C. Thomassin-Orphanides pour la frappe de ce manuscrit.

Reçue le 15 décembre 1986.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] S. HAKOMORI, *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 1981, p. 733-764.
- [2] R. W. LEDEEN, *J. Neurosc. Res.*, 12, 1984, p. 147-159.
- [3] B. PETTMANN, J. C. LOUIS et M. SENSENBRENNER, *Nature*, 281, 1979, p. 378-380.
- [4] J. C. LOUIS, B. PETTMANN, J. COURAGEOT, J. F. RUMIGNY, P. MANDEL et M. SENSENBRENNER, *Exp. Brain Res.*, 42, 1981, p. 63-72.
- [5] R. MASSARELLI, B. FERRET, A. GORIO, M. DURAND et H. DREYFUS, *Int. J. Dev. Neurosc.*, 3, 1985, p. 341-348.
- [6] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, p. 265-275.
- [7] E. BROWN, D. A. KENDALL et S. R. NAHORSKI, *J. Neurochem.*, 42, 1984, p. 1379-1387.
- [8] R. H. MICHELL, *Cell Calcium*, 3, 1982, p. 285-289.
- [9] Y. NISHIZUKA, *Nature*, 308, 1984, p. 693-698.

Centre de Neurochimie du C.N.R.S. et Unité n° 44 de l'I.N.S.E.R.M.,
5, rue Blaise-Pascal, 67084 Strasbourg Cedex.

modifications morphologiques et biochimiques (2). Les tels effets laissent supposer que les ganglions, après leur réaction dans le système ganglionnaire, peuvent produire des réponses cellulaires par l'intermédiaire de seconds-messagers. L'ensemble des résultats obtenus montre que les ganglions contiennent le métabolisme des composés à base de cholestérol à la production d'ATP et de DAG, l'ATP et la capacité de modifier les ions calcium intracellulaires (3) et le DAG est un activateur de la protéine kinase C (PKC). En effet, les résultats récents montrent que l'activation des ganglions dans le milieu de culture des neurones augmente la production de DAG intracellulaire (résultats non publiés). Ces données suggèrent que les ganglions, par l'intermédiaire des seconds-messagers (IP₃ et DAG), peuvent réguler les processus de phosphorylation protéique impliqués dans la modulation des réponses cellulaires.

Les auteurs tiennent à remercier M. A. G. pour son aide technique et M. C. pour son aide technique.

Reçu le 12 décembre 1958.

Revisé le 15 décembre 1958.

1. J. W. L. et J. W. L., *Journal of Neurophysiology*, 22, 1000-1005, 1959.

2. J. W. L. et J. W. L., *Journal of Neurophysiology*, 22, 1006-1011, 1959.

3. J. W. L. et J. W. L., *Journal of Neurophysiology*, 22, 1012-1017, 1959.

4. J. W. L. et J. W. L., *Journal of Neurophysiology*, 22, 1018-1023, 1959.

5. J. W. L. et J. W. L., *Journal of Neurophysiology*, 22, 1024-1029, 1959.

6. J. W. L. et J. W. L., *Journal of Neurophysiology*, 22, 1030-1035, 1959.

7. J. W. L. et J. W. L., *Journal of Neurophysiology*, 22, 1036-1041, 1959.

8. J. W. L. et J. W. L., *Journal of Neurophysiology*, 22, 1042-1047, 1959.

9. J. W. L. et J. W. L., *Journal of Neurophysiology*, 22, 1048-1053, 1959.

10. J. W. L. et J. W. L., *Journal of Neurophysiology*, 22, 1054-1059, 1959.

11. J. W. L. et J. W. L., *Journal of Neurophysiology*, 22, 1060-1065, 1959.

12. J. W. L. et J. W. L., *Journal of Neurophysiology*, 22, 1066-1071, 1959.

13. J. W. L. et J. W. L., *Journal of Neurophysiology*, 22, 1072-1077, 1959.

Les auteurs tiennent à remercier M. A. G. pour son aide technique et M. C. pour son aide technique.

Reçu le 12 décembre 1958.

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — Influence de la substitution de l'atome d'hydrogène en position 1 ou 2 de l'indole par un groupement carboxyméthyle sur la croissance de la racine de Lentille. Comparaison avec l'acide indolyl-3 acétique et l'indole. Note de Jacques Dubouchet, Alain Seguin et Joël Vebrel, présentée par Henri Duranton.

Les effets des acides indolyl-1 acétique (AIA-1) et indolyl-2 acétique (AIA-2) sur le développement de la plantule de Lentille cultivée dans l'obscurité pendant 72 h sont précisés en comparaison avec ceux de l'acide indolyl-3 acétique (AIA-3) et de l'indole. De 10^{-7} M à 10^{-5} M, la croissance de la racine est stimulée temporairement par l'AIA-2, ralentie durablement par l'AIA-1, momentanément par l'AIA-3. Pour 10^{-4} M, elle est fortement réduite par chaque acide indolylacétique. Le maintien de l'inhibition créée par l'AIA-1 est accompagné de modifications structurales de la plantule.

PLANT PHYSIOLOGY. — Influence of the substitution of a carboxymethylgroup ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) for a H atom on position 1 or 2 of the indole nucleus on growth of Lentil root grown in darkness for 72 hrs. Correlative study with IAA and indole.

Growth properties of exogenously applied indol-1 ylacetic acid (I1 AA) and indol-2 ylacetic acid (I2 AA) were investigated using Lentil plantlets grown in darkness for 72 hrs. Comparative bioassays were carried out with indol-3 ylacetic acid (I3 AA) and indole. From 10^{-7} M to 10^{-5} M, root growth is promoted for a short period by I2 AA, inhibited continuously by I1 AA and temporarily by I3 AA. At 10^{-4} M, root growth is slowed down by every indolylacetic acid and with I1 AA, root structure is altered.

INTRODUCTION. — La substitution de l'atome d'hydrogène en position 1 ou 2 de l'indole par un groupement carboxyméthyle ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) confère à la molécule (acide indolyl-1 acétique : AIA-1; acide indolyl-2 acétique : AIA-2) la propriété de stimuler l'élongation des fragments de coléoptile de Blé ([1], [2]). Aux faibles concentrations, la stimulation est inférieure à celle déclenchée par l'acide indolyl-3 acétique (AIA-3); aux fortes concentrations ($3 \cdot 10^{-5}$ M; 10^{-4} M), et pour l'AIA-1, elle lui est très voisine. Or, il est admis ([3], [4]) que les teneurs en AIA-3 qui accélèrent la croissance du coléoptile, ralentissent l'allongement de la racine tandis que celles qui sont peu actives (ou inactives) le favorisent. En conséquence, il était intéressant d'estimer l'activité, sur la racine, de l'AIA-1 et de l'AIA-2, les données étant imprécises pour le premier ([5], [7], [2]), inexistantes pour le second ([6], [7], [2]).

Le but de cette Note est de préciser (en comparaison avec l'AIA-3 et l'indole), l'effet, en fonction du temps, de ces deux isomères de position sur la croissance de la racine de Lentille (non séparée de la plantule) et les conséquences au niveau de l'épicotyle.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE. — Les substances éprouvées sont d'origine commerciale à l'exception de l'AIA-2 qui a été synthétisé selon un protocole décrit ailleurs ([2], [8]). Leur structure a été vérifiée par l'usage des techniques spectroscopiques (IR, RMN ^1H , spectrométrie de masse). Les caractéristiques du spectre IR de l'AIA-2 [8] suggèrent que cette molécule présente une conformation particulière (I, fig. 2) consécutive à l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre NH et le groupe C=O de la fonction COOH.

Les plantules de Lentille (*Lens culinaris* var. large et blonde) sont obtenues dans l'obscurité et à $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Elles sont issues de graines dont la masse est comprise entre 55 et 65 mg; au début de l'essai, la racine mesure $6,45 \pm 0,12$ mm. Ces plantules sont disposées sur des supports appropriés permettant leur développement en position verticale [2]. Les racines ne sont jamais immergées mais seulement en contact par deux faces opposées avec le papier filtre imprégné de la solution choisie. Le milieu de culture est une solution-tampon de pH 5,9 ($\text{Na H}_2\text{PO}_4$, $2 \text{H}_2\text{O}$: 0,15 M; Na_2HPO_4 : 0,05 M) contenant ou non le composé indolique choisi préalablement dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). La teneur finale en DMSO de chaque milieu ($2,5 \cdot 10^{-5}$ M) est sans action sur la croissance de la racine [2].

L'activité de chaque substance est définie par l'analyse des variations, de 6 à 72 h, de l'allongement (obscurité; $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$) de l'axe plantulaire : racine et hypocotyle (extérieurement indistinct de la racine s.str.) [2] d'une part, épicotyle d'autre part.

A 6, 12, 24, 48 et 72 h et pour chaque concentration (10^{-7} M à 10^{-4} M), la différence entre l'allongement absolu ($\Delta\text{L} = \text{longueur moyenne au temps } t_n - \text{longueur moyenne au temps } t_0$) des racines traitées ($\Delta\text{L TR}$) et celui des témoins ($\Delta\text{L TE}$) est exprimée en fonction de $\Delta\text{L TE}$ et en pourcentage ($p\%$) :

$$p\% = \frac{\Delta\text{L TR} - \Delta\text{L TE}}{\Delta\text{L TE}} \cdot 10^2$$

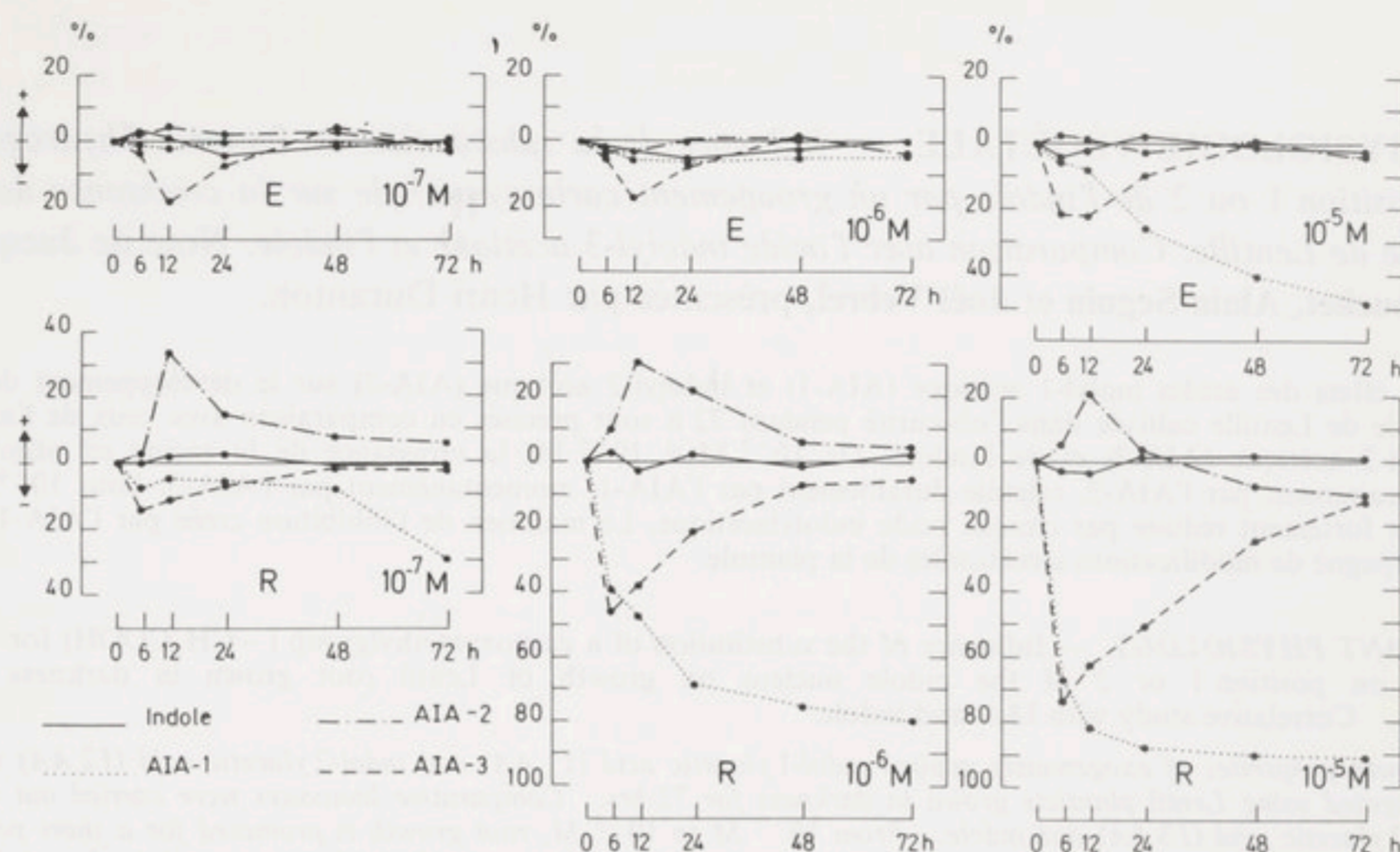


Fig. 1. — Effet, en fonction du temps (6-72 h), de l'indole et des acides indolyl-1 acétique (AIA-1), indolyl-2 acétique (AIA-2) et indolyl-3 acétique (AIA-3) utilisés à différentes concentrations (M) sur la croissance de la racine (R) et de l'épicotyle (E) de la plantule de Lentille. L'effet est exprimé en % par rapport à l'allongement des témoins ($p\%$). La longueur moyenne (mm) des racines et épicotyles témoins est à chaque temps :

Temps (h)	R	E
0.	6,45 ($\pm 0,12$)	2,46 ($\pm 0,19$)
6.	8,18 ($\pm 0,26$)	4,53 ($\pm 0,29$)
12.	10,81 ($\pm 0,57$)	6,22 ($\pm 0,32$)
24.	19,04 ($\pm 1,09$)	11,35 ($\pm 0,49$)
48.	39,64 ($\pm 1,66$)	22,18 ($\pm 1,05$)
72.	53,17 ($\pm 2,61$)	32,27 ($\pm 1,84$)

Les chiffres entre parenthèses correspondent à l'intervalle de confiance de la moyenne pour $P=0,95$.

Fig. 1. — Comparative activity of indole, indol-1ylacetic acid (AIA-1) indol-2ylacetic acid (AIA-2) and indol-3ylacetic acid (AIA-3) at different concentrations (M) on growth of lentil root (R) and epicotyl (E).

Chaque moyenne a été obtenue à partir de 150 valeurs individuelles représentant cinq à six essais. Les paramètres caractérisant chaque série statistique (écart-type, erreur standard, intervalle de confiance de la moyenne pour $P=0,95$) sont rapportés ailleurs [2]. Dans cette Note sont présentées les variations de l'effet relatif ($p\%$) de chaque composé indolique.

RÉSULTATS. — 1. *Indole*. — Quelle que soit sa concentration (fig. 1 et 2), cette substance est sans action sur la plantule de Lentille.

2. *Acides indolylacétiques*. — Les figures 1 et 2 montrent que l'activité de chaque acide indolylacétique dépend, en particulier, de la teneur du composé dans le milieu de culture, de la situation du groupement $-\text{CH}_2\text{COOH}$ sur l'hétérocycle et de l'instant où elle est appréciée.

2.1. *Concentrations comprises entre 10^{-7} M et 10^{-5} M*. — Lorsque le groupement carboxyméthyle est situé en position 2 (AIA-2), l'allongement de la racine est stimulé (fig. 1), l'effet étant le plus net à 12 h pour 10^{-7} M (+34 % par rapport au témoin). L'épicotyle n'est pas touché.

Lorsqu'il est en position 1 (AIA-1), la croissance de la racine est, au cours des 6 premières heures de l'essai, nettement ralentie pour 10^{-6} M et 10^{-5} M, avec une intensité semblable à celle causée par l'AIA-3 (fig. 1). Ensuite, l'inhibition croît, atteint une plus grande valeur vers 24 h et persiste, à la différence de celle déclenchée par

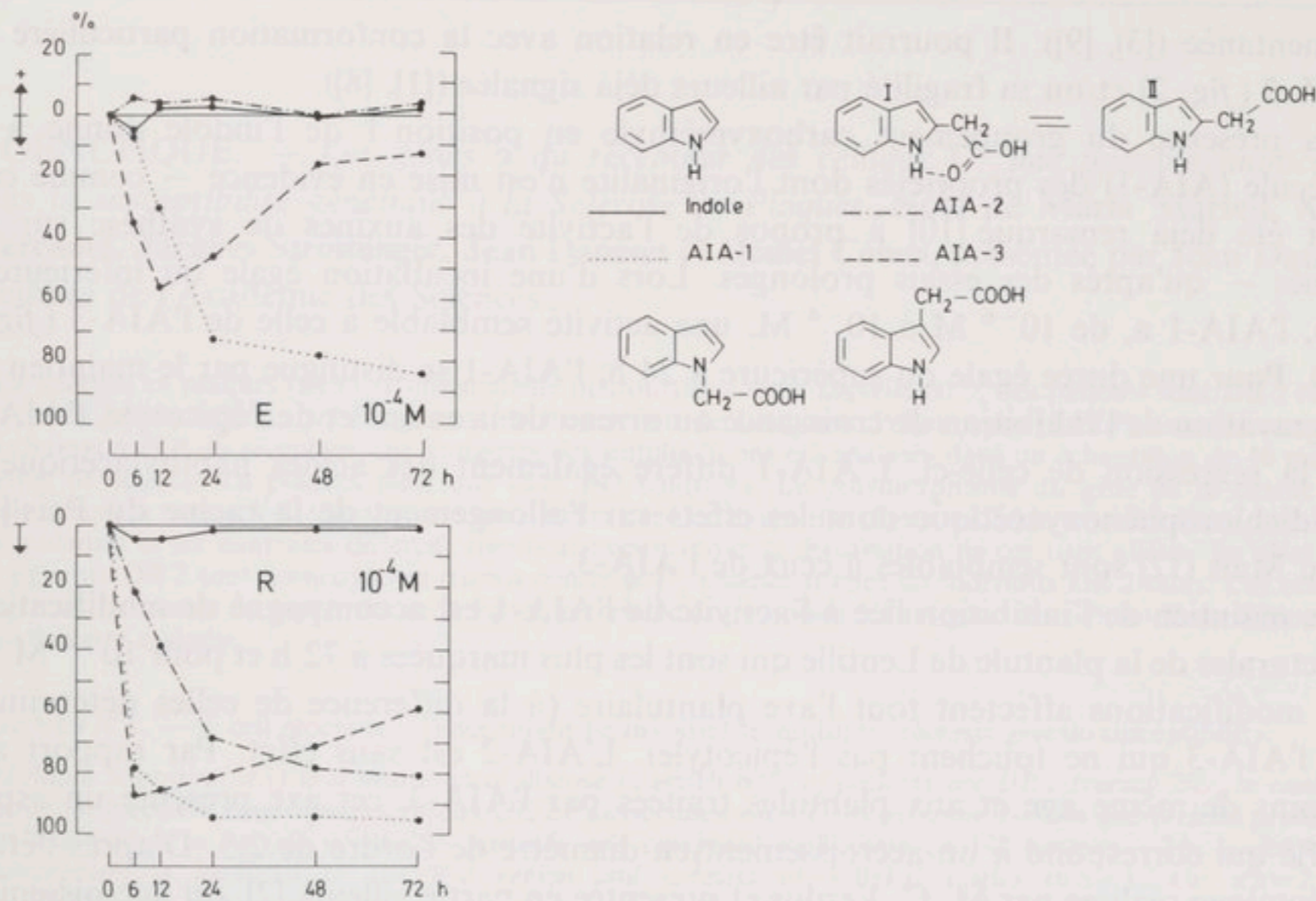


Fig. 2. — Effet, en fonction du temps (6-72 h), de l'indole et des acides indolyl-1 acétique (AIA-1), indolyl-2 acétique (AIA-2) et indolyl-3 acétique (AIA-3) utilisés à la concentration de 10^{-4} M sur la croissance de la racine (R) et l'épicotyle (E) de la plantule de Lentille. L'effet est exprimé en % par rapport à l'allongement des témoins ($p\%$).

Fig. 2. — Comparative activity of indole, indol-1ylacetic acid (AIA-1), indol-2ylacetic acid (AIA-2) and indol-3ylacetic acid (AIA-3) at 10^{-4} M on growth of lentil root (R) and epicotyl (E).

l'AIA-3 qui régresse et s'annule. Cette différence se retrouve, pour 10^{-5} M, au niveau de l'épicotyle où elle est appréciable dès 24 h.

2.2. Concentration de 10^{-4} M. — Chaque acide indolylacétique inhibe l'allongement de la racine (fig. 2). La plus grande part de ce processus se développe en 6 h avec l'AIA-1 et l'AIA-3, en 24 h avec l'AIA-2. Après, l'inhibition augmente en présence d'AIA-1 et d'AIA-2, diminue en présence d'AIA-3. Bien que les trois acides indolylacétiques réduisent le grandissement de la racine de Lentille, les conséquences au niveau de l'épicotyle sont distinctes. Avec l'AIA-2, la croissance de cet organe n'est pas modifiée par rapport à celle du témoin. Par contre, avec l'AIA-1 et l'AIA-3, elle est ralentie plus ou moins durablement : de 0 à 12 h pour l'AIA-3 ou 24 h pour l'AIA-1 s'installe une inhibition qui, ensuite, s'amenuise (AIA-3) ou perdure (AIA-1) comme dans le cas de la racine.

DISCUSSION ET CONCLUSION. — Nos résultats confirment l'inaction de l'indole sur la plantule de Lentille [9]. Ce constat n'implique nullement l'inefficacité de cette substance sur d'autres espèces végétales : des essais réalisés dans les mêmes conditions avec des plantules de Cresson [2] indiquent que l'indole est capable de ralentir la croissance de la racine pour des concentrations égale ou supérieures à 10^{-6} M. Dans le cas de la Lentille, les effets de chaque acide indolylacétique traduisent donc l'activité du groupement $-\text{CH}_2\text{COOH}$ en fonction de sa situation sur le noyau indole.

La présence de ce groupement en position 2 rend la molécule (AIA-2) capable, selon sa concentration, de stimuler temporairement (10^{-7} M) ou d'inhiber durablement (10^{-4} M) la croissance de la racine de Lentille sans perturber l'épicotyle. Ce comportement diffère de celui de l'AIA-3 caractérisé (fig. 1 et 2) par son action inhibitrice et

momentanée ([3], [9]). Il pourrait être en relation avec la conformation particulière de l'AIA-2 (fig. 2) et/ou sa fragilité par ailleurs déjà signalée ([1], [8]).

La présence du groupement carboxyméthyle en position 1 de l'indole donne à la molécule (AIA-1) des propriétés dont l'originalité n'est mise en évidence — comme cela avait été déjà remarqué [10] à propos de l'activité des auxines de synthèse sur les racines — qu'après des essais prolongés. Lors d'une incubation égale ou inférieure à 12 h, l'AIA-1 a, de 10^{-6} M à 10^{-4} M, une activité semblable à celle de l'AIA-3 (fig. 1 et 2). Pour une durée égale ou supérieure à 24 h, l'AIA-1 se distingue par le maintien ou l'aggravation de l'inhibition de croissance au niveau de la racine et de l'épicotyle, l'AIA-3, par la régression de celle-ci. L'AIA-1 diffère également des acides naphthylacétique et 2,4-dichlorophénoxyacétique dont les effets sur l'allongement de la racine du Pois [11] et du Maïs [12] sont semblables à ceux de l'AIA-3.

Le maintien de l'inhibition liée à l'activité de l'AIA-1 est accompagné de modifications structurales de la plantule de Lentille qui sont les plus marquées à 72 h et pour 10^{-4} M [2]. Ces modifications affectent tout l'axe plantulaire (à la différence de celles déterminées par l'AIA-3 qui ne touchent pas l'épicotyle). L'AIA-2 est sans effet. Par rapport aux témoins de même âge et aux plantules traitées par l'AIA-3, cet axe présente un aspect gonflé qui correspond à un accroissement en diamètre de l'ordre de 2,5. D'après l'étude anatomique réalisée par M. C. Verdus et présentée en partie ailleurs [2], cet accroissement est dû à des réalisations qui dépendent de l'organe examiné. Au niveau de la racine et de l'hypocotyle, les formations secondaires liberoligneuses sont plus développées. Les radicules sont plus nombreuses. Leur allongement est, comme celui de la racine principale, bloqué. Dès lors, elles restent incluses dans le parenchyme cortical qui se trouve repoussé et distendu. Au niveau de l'épicotyle, seul le parenchyme cortical présente un plus grand nombre d'assises cellulaires. Ces résultats font l'objet d'un travail en cours de rédaction. Ils contribuent à mettre en relief les propriétés liées à la position du groupement carboxyméthyle sur l'indole. Ils nous incitent à poursuivre l'étude de ces molécules par l'analyse comparée de leur catabolisme.

Reçue le 17 novembre 1986.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J. DUBOUCHET, A. SEGUIN, J. VEBREL et B. LAUDE, *Comptes rendus*, 299, série III, 1984, p. 819-822.
- [2] A. SEGUIN, *Thèse de Doctorat d'État*, Université de Besançon, 1985.
- [3] P. E. PILET, *Les Phytohormones de Croissance*, Masson, Paris, 1961.
- [4] M. L. EVANS, In *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, 10, *Hormonal regulation of development II*, T. K. SCOTT éd., 1984, p. 23-79.
- [5] J. A. FARRIMOND, M. C. ELLIOT et D. W. CLACK, *Nature*, 274, 1978, p. 401-402.
- [6] K. V. THIMANN, *Hormonal Regulation in Plant Growth and Development*, *Proc. Adv. Study Inst. Izmir*, 1971, p. 155-170. H. KALDEWEY et Y. VARDAR éd., 1972.
- [7] J. L. STODDART et M. A. VENIS, in *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, 9, *Hormonal regulation of development I*, J. MACMILLAN éd., 1984, p. 445-510.
- [8] VEBREL J., B. LAUDE, A. SEGUIN et J. DUBOUCHET, *Spectrochimica Acta*, 39, 1983, p. 887-894.
- [9] P. E. PILET, J. BONHOTE et M. BAILLOD, *Comptes rendus*, 249, 1959, p. 2098-2100.
- [10] H. BURSTRÖM, *Am. J. Bot.*, 56, 1969, p. 679-684.
- [11] L. J. AUDUS et J. K. BAKHSH, in *Plant Growth Regulation*, 4th International Conference on Plant Growth Substances, Iowa State University Press, Ames Iowa, R. M. KLEIN éd., 1961, p. 109-126.
- [12] J. A. GOUGLER et M. L. EVANS, *Physiol. Plant.*, 51, 1981, p. 394-398.

J. D. : *Laboratoire de Physiologie végétale, Institut des Sciences naturelles, 1, place Maréchal-Leclerc, 25030 Besançon Cedex;*

J. V. : *Laboratoire de Chimie organique, 1^{er} cycle, Faculté des Sciences, route de Gray, La Bouloie, 25030 Besançon Cedex;*

A. S. : *Laboratoire de Physiologie végétale, Faculté des Sciences, Université d'Abidjan, B.P. n° 322, Abidjan 04, R.C.I.*